

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-208918

(43)公開日 平成5年(1993)8月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	Y	8413-4C		
	W	8413-4C		
9/08	F	7329-4C		

審査請求 有 発明の数 3 (全 7 頁)

(21)出願番号	特願平4-203184
(62)分割の表示	特願昭57-144887の分割
(22)出願日	昭和57年(1982)8月23日
(31)優先権主張番号	2 9 5 9 1 6
(32)優先日	1981年8月24日
(33)優先権主張国	米国 (U S)

(71)出願人	592164801 カッター・ラボラトリーズ・インコーポレ ーテッド CUTTER LABORATORIES INCORPORATED アメリカ合衆国カリフォルニア州94701バ ークレイ・ポストオフィスボックス1986・ フォースアンドパーカーストリート (番地 なし)
(72)発明者	ロバート・エイ・テノルド アメリカ合衆国カリフォルニア州94510ベ ニシア・アパートメントナンバー29・ウェ ストエルストリート979
(74)代理人	弁理士 小田島 平吉

(54)【発明の名称】 静注可能な免疫グロブリン

(57)【要約】

【構成】 治療量の免疫血清グロブリンの水溶液から成り、該溶液は5%蛋白質濃度における溶液が15NTUよりも小さい比濁分析の読み、3.5~5.0のpH及び生理学的に許容しうる張度を有するようなイオン強度を有することを特徴とする、安定な、無菌の、静脈注射可能な製薬組成物並びにその組成物のための処理方法。

【効果】 静脈注射可能な組成物が提供される。

31

【特許請求の範囲】

【請求項1】 治療量の免疫血清グロブリンの水溶液から成り、該溶液は5%蛋白質濃度における溶液が15 NTUよりも小さい比濁分析の読み、3.5~5.0のpH及び生理学的に許容しうる張度を有するようなイオン強度を有することを特徴とする、安定な、無菌の、静脈注射可能な製薬組成物。

【請求項2】 生理学的に許容しうる張度を溶液に与えるに充分な量で、炭水化物、糖アルコール及びアミノ酸より成る群から選らばれる物質を包含する、特許請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項3】 (a) 免疫血清グロブリンの溶液を生成せしめ、

(b) 該溶液のpHを3.5~5.0に調節し、且つ

(c) 該溶液のpHを3.5~5.0に保ちながら、溶液のイオン強度($\Gamma/2$)を5%蛋白質濃度における溶液が約15 NTUよりも小さい比濁分析の読みを有するような水準まで低下させるべく処理する、ことを特徴とする、免疫血清グロブリンを静脈注射可能ならしめるための処理方法。

【請求項4】 段階(a)における溶液が0.5~20重量%の蛋白質濃度を有する、特許請求の範囲第3項記載の方法。

【請求項5】 (d) 溶液に炭水化物、糖アルコール及びアミノ酸より成る群から選らばれる物質を加えることによつて、それを緊張性ならしめるべくに処理し、且つ

(e) 溶液を滅菌する、
段階をさらに包含する、特許請求の範囲第3項記載の方法。

【請求項6】 水溶液にしたとき、3.5~5.0のpH、5%蛋白質濃度における溶液が15 NTUよりも小さい比濁分析の読みを有するようなイオン強度($\Gamma/2$)および3.5~5.0のpHを有する免疫血清グロブリンから成ることを特徴とする、乾燥組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は新規な、静脈注射可能な免疫血清グロブリンから成る製薬組成物、その製造方法及び人の治療に対して免疫血清グロブリンを静脈注射によつて投与するためのその使用に関するものである。

【0002】筋肉注射の可能なガンマグロブリン製剤は公知である。このような製品の一つは“ハイパーテッド”(カッターラボラトリーズ・インコーポレーテッド、バークレー、カリホルニア)である。

【0003】通常の筋注用ガンマグロブリン製剤は、特に無ガンマグロブリン血症患者においては、受け入れ難いほど高い反応の発生のために、安全に静脈注射によつて投与することはできない。これらの反応は明らかに、投与したガンマグロブリンによる補体結合によつて生じる血清補体濃度の低下を伴う[S. Barandum ら、Vox Sang. 7, 157~174 (1962)]。抗補体性と呼

ばれるガンマグロブリンの補体結合能力は、特に高分子量種への凝集によつて、特に分別操作の間に生じる変性の結果として、著るしく増大する。これらの凝集物の補体結合機構は、抗原-抗体複合体におけるものと同一であると考えられる[D. M. Marcus, J. Immunol. 84, 273~284 (1960)]。100,000×重力における超遠心によつて凝集物を除去するときは、静脈注射に十分に耐える抗補体活性の低い製品が得られる(Barandum ら、前記文献)。

【0004】ガンマグロブリンを静脈注射による投与に対して安全なものとするために、多くの試みがなされている。これはすべてガンマグロブリンの抗補体活性を除くことに依存している。超遠心(前記)は技術的に不適当であつて、それによつて得られる製品は貯蔵中に再びその抗補体活性を回復する。

【0005】pH4.0における酵素ペプシンによるガンマグロブリンの処理は、分子の蛋白質加水分解的な開裂を生じさせて、約5Sの超遠心における沈降係数を有する約10,000の分子量の分屑を与える[A. Nisonoff ら、Science, 132, 1770~1771 (1960)]。この残存分屑は、2価の抗体活性を保存し、且つ抗補体活性を欠いているので、静脈注射による投与に十分に耐え且つ有効である[W. Baumgarten, Vox Sang. 13, 84 (1967)]。けれども、未変性のガンマグロブリンに対する19.8日と比較して、無ガンマグロブリン血症患者においてはいくらか長いものの、僅か18時間という循環半減期によつて迅速に排泄してしまうために、得られる治療効果は受け入れ難いほど短かい持続時間を有しているにすぎない[E. Merler ら、Vox Sang. 13, 102 (1967); B. Jager, Arch. Intern. Med. 119, 60 (1967)]。ペプシン処理したガンマグロブリンの著るしい半減期の低下は、恐らくは部分的に分子の大きさの激減によるものと思われるけれども、ガンマグロブリンの分解代謝の速度は、ペプシンによつて消化された分子の部分の特異性に関係するという指摘がある[J. L. Fahey ら、J. Exper. Med., 118, 1845~1868 (1963)]。分子のこの部分は、本発明においては元のままに残っている。ペプシン処理方法のもう一つの欠点は、残存しているペプシンが動物性のものであつて、特に繰返し投与において、抗体の生産を刺激する可能性があるということである[C. Blatrix ら、Presse Med. 77, 635~637 (1969)]。人間からのプラスミンの使用は、この問題を排除することができるので、静注用ガンマグロブリンの製造のための異なる方法の基礎となる。

【0006】人のプラスミンによるガンマグロブリンの処理は、分子量約50,000の3成分への開裂をもたらず[J. T. Sgouris, Vox Sang. 13, 71 (1967)]。十分に低濃度のプラスミンを使用するならば、約15%の分子が開裂するのみで、85%が元のままの

ガンマグロブリンとして残留する (Sgouris, 上記文献)。消化されずに残る元のままのガンマグロブリンは、ほとんど抗補体活性を示さず、不利な反応なしに静脈内に投与することができる [J. Hinman ら、Vox Sang. 13、85 (1967)]。このようにして調製した材料は、試験管内及び生体内保護活性を維持するものと思われる [F. K. Zitzpatrick, Vox Sang. 13、85 (1967)]。この解決方法の欠点は、プラスミンを完全に除去することができないということである。そのため、材料を4℃において貯蔵するときにすら、劣化が継続する。

【0007】pH4.0において37℃で種々の時間にわたってガンマグロブリンを温置すると、抗補体活性が低い水準に低下することが認められている。この結果は、ガンマグロブリン中に不純物として存在する少量の血清酵素によつて生じるのではないかということが示唆されている (Blatrix ら、前記文献)。プラスミン処理したガンマグロブリンにおけると同様に、この“pH4.0ガンマグロブリン”は貯蔵中に、予測し得ない速度で、抗補体活性を回復することが見出されているので、患者に投与する前に抗補体活性を測定することが必要である [J. Malgras ら、Rev. Franc. Trans. 13、173 (1970)]。

【0008】プラスミン処理ガンマグロブリン (Hinman ら、前記) 及びpH4.0ガンマグロブリン [H. Koblet ら、Vox Sang. 13、93 (1967) ; J. V. Wells ら、Austr. Ann. Med. 18、271 (1969) ; Barandun ら、Monogr. Allergy, 9、39~60 (1975) ; Barandun ら、Vox Sang., 7、157~174 (1962)] は生体内で未変性ガンマグロブリンよりも短い半減期を有している。たとえば、pH4.0ガンマグロブリンの通常患者中における半減期は約14日 (Koblet ら、前記) であり、一方プラスミン処理物は16日 (Merler ら、前記) の半減期を示す。

【0009】パリの Center National de Transfusion Sanguine (C. N. T. S.) は選択した新鮮な血漿からのガンマグロブリンの注意深い分画と濾過によつて、低抗補体活性を有する静脈内注射の可能なガンマグロブリンを生産している [Blatrix ら、前記 ; 同、Presse Med, 77、159~161 (1969) ; M. Steinbuch ら、Vox Sang. 13、103 (1967)]。これは注意して投与しなければならず、また実際に一部の患者には反応が生じていることからみて、抗補体活性を完全に欠いているものとは思われない。このような反応を排除するためには注射前にコーチゾンを与えればよいが、抗補体活性の明らかに不完全な除去は、その広範囲にわたる使用に対しては好ましくないものと思われる。

【0010】ガンマグロブリンのジスルフィド結合を還元したのち末端封鎖剤と反応させることの抗補体活性に対する効果は、既に研究されている。バランダンら (S.

Barandun, 前記) はガンマグロブリンの溶液を0.2Mシステアミンによつて、次いで0.2Mヨードアセトアミドによつて処理すると、ほとんど完全な抗補体活性の喪失が生じるのに対して、システアミンまたはヨードアセトアミド単独による処理は抗補体活性を顕著に低下させないことを見出した。ヨードアセトアミドの毒性のために、これらの研究者は静脈注射可能なガンマグロブリンへのこの解決方法を追究しなかつた。

【0011】変性した免疫血清グロブリンは米国特許第3,903,262号に記されている。先ず分子中のジスルフィド結合の一部を-SH基に還元したのち、-SH基をアルキル化することによつて、免疫血清グロブリンを静脈注射可能ならしめた。反応混合物から生成物を分離したのち、それを滅菌した。このようにして得た生成物は静脈注射が可能であり、実際の及び潜在的な抗補体活性の何れをも実質的に有していず、相当する未変性免疫血清グロブリンの抗補体活性の生理学的半減期及びスペクトルを実質的に有していた。

【0012】現在、いくつかの静脈注射の可能なガンマグロブリンを米国以外で入手することができる。このような製品の一つはフランクフルトのバイオテスト社のイントラグロビンである。この製品はガンマグロブリンのベータープロピオラクトン処理によつて製造する [Stephan, Vox Sang., 28、422~437 (1975)]。この材料は、約0.18のナトリウムイオンと約0.27の塩素イオンのモル濃度を有している。その製造において使用するベータープロピオラクトンは発ガン物質として疑われている。

【0013】別の静脈注射可能な製品は、日本のミドリ十字社によつて製造されている (米国特許第4,168,303号)。これは、20℃以下H50以下の抗補体活性と重量で0.06~0.26部のたとえば塩化ナトリウムのような中性無機塩を有している、凍結乾燥した、天然ガンマグロブリン製剤である。

【0014】スイスの赤十字は静脈内投与のための免疫グロブリンSRCを有している。SRCは80%を超える単量体としてのIgGと比較的僅かな割合の2量体、重合体及び開裂したIgG並びに痕跡のIgAとIgMを含有している。IgG亜鋼の分布は正常な血清のそれと等しい。この製品は凍結乾燥した形態で製造され、1単位当たり3gの蛋白質、5gの蔗糖及び少量の塩化ナトリウムを含有している。希釈物(100ml)は0.9%の塩化ナトリウムを含有する。

【0015】ヴェノグロブリン (日本のミドリ十字製) はガンマグロブリンをプラスミンで処理することによつて製造される。これもまた重量で1部のプラスミン処理ガンマグロブリン当りに0.5部の蛋白質安定剤 (たとえばアミノアセート) を含有している。この製品は白色粉末として市販され、希釈剤に溶解して使用する。生成する溶液は透明であるか、または僅かに濁っており、

6.4~7.4のpHを有している。

【0016】西ドイツのシュワツプによつても静脈注射の可能なガンマグロブリンが開発されており、これは50mg/mlの免疫グロブリン、7mg/mlのグリシン及び7mg/mlの塩化ナトリウムを含有している。

【0017】ヴェイノグロブリンはフランスのメリュー研究所から入手することができる。これは5gの蛋白質及びpHと安定性の確保に十分なグリシン及び塩化ナトリウムを含有している凍結乾燥粉末として市販されている、プラスミン処理ガンマグロブリンである。100ml 10 1当り0.9gの塩化ナトリウムまたは等張性グルコースを含有する水溶液が注射用として用いられる。

【0018】西ドイツのベーリングウエルケAGに譲渡された米国特許第4,160,763号は、免疫グロブリン分屑を低濃度の亜硫酸加水分解剤及び/または水に難溶性のリン酸塩で処理することによつて製造した、低下した補体固定を有する静脈内投与のための免疫グロブリンに対するものである。この材料のpHは7.0であり、製品は凍結乾燥前に0.85%の塩化ナトリウムと2.5% (重量/容量) のグリシンを含有している。 20

【0019】東京の帝人研究所は、新規免疫グロブリン誘導体に対する米国特許第4,059,571号の記録の譲受人である。新規誘導体を含有する静脈内投与用の水溶性組成物を記している。この誘導体は、ガンマグロブリンの開裂した連鎖間ジスルフィド結合のS-スルホン化物である。

【0020】ペプシン処理した人の免疫グロブリンであるグロヴェニンは日本の日本製薬の製品である。典型的には、上記の製品の溶液は50mg/mlのペプシン処理免疫グロブリン、2.25% (重量/容量) のアミノ 30 酢酸及び0.85% (重量/容量) の塩化ナトリウムを含有している。

【0021】山之内製薬はグロブリンVの販売業者であるが、これは225mgのアミノ酢酸と85mgの塩化ナトリウムを含有する乾燥したペプシン処理ヒト免疫グロブリン(500mg)である。静脈内投与のためには、乾燥製品を10mlの水に溶解して注射に供する。

【0022】本発明者は、免疫血清グロブリンの単量体濃度が約90%よりも大であり且つ広い範囲の患者に対して免疫血清グロブリンを静脈内投与できる程度に実際の 40 及び潜在的抗補体活性を持続するようなイオン強度及びpHを有する、変性した静脈内注射の可能な免疫血清グロブリンを見出した。

【0023】本発明の製品は、免疫血清グロブリン(ISG)を可溶化して所定の蛋白質濃度の溶液とする。ISGの単量体含量が約90%よりも高く且つ实际的及び潜在的抗補体活性がISG製品を静脈内注射可能ならしめる程度となるような水準に、この溶液のpHを調節し 50 且つ溶液のイオン強度を低下させる。pHとイオン強度は、蛋白質濃度の調節、滅菌、最終的な容器への充填な

どの間、上記の水準に保つ。

【0024】本発明のISGの一利点は、静脈注射が可能であることによつて、筋肉注射に伴う問題を排除することができるということである。その上、本発明の製品は、還元-アルキル化、ペータープロピオラクトン処理などにおいて生じるような化学的な変性を実質的に伴わない。

【0025】本発明の製品の重要な一特色は、实际的及び潜在的抗補体活性を実質的に有しておらず且つまた重合体状の物質、すなわち、“凝集物”を実質的に含有していないということである。特に、本発明の製品は、従来の製剤よりも向上した安定性を示す。この材料は、その単量体含量と实际的及び潜在的抗補体活性の欠如を維持しつつ、添加剤の存在なしで長期間にわたつて室温で保存することができる。

【0026】本発明のもう一つの利点は、静脈注射の可能なISGの物理的測定値と生理学的機能がほとんど変化しないということである。すなわち、本発明の材料の抗体力価は出発材料と著るしくは異ならない。

【0027】好適実施形態の説明

本発明の方法のための出発材料は、未変性の人の免疫血清グロブリンである。本明細書中の説明及び特許請求の範囲中で“免疫血清グロブリン”という用語は、文献中でガンマグロブリン、IgG及び免疫グロブリンGとしてもまた種々言及されている物質を定義するために用いる。これは、主として且つ好ましくは、少なくとも約85%の、約160,000の分子量を有する、ガンマグロブリンの7S種から成っている。残りの部分は、約300,000の分子量を有する、9S種であることが好ましい。標準的な免疫及び高度免疫(hyperimmune)血清グロブリン、たとえば、破傷風、狂犬病及び肝炎免疫血清グロブリン、の両者を使用することができるが、変性生成物は、それぞれ、免疫及び高度免疫ISGである。すなわち、本発明の方法に対する適当な出発材料は、コーンの分屑IIまたは分屑III濾過物である [Cohn ら、J. Am. Chem. Soc., 68、459 (1946) ; Oncley ら、ibid., 71、541 (1949) 参照]。

【0028】分屑IIは、超遠心による研究によると、主として160,000の平均分子量を有する(約85%) 7S (沈降系数7) 種のガンマグロブリンである。残りの蛋白質は本質的に約300,000の分子量を有する9S材料である。湿つた分屑IIペースト(固形分約30%)を通常のようにして凍結乾燥して乾燥ISG粉末とし、次いでそれを溶解して16.5%の無菌溶液として筋肉注射用に調製する。本発明の方法に対しては、湿つた分屑IIペーストまたは乾燥ISG粉末の何れも、適当な出発材料である。

【0029】本発明の方法の出発物質としては、コーン分屑IIまたは分屑III濾液中に認められるものと本

質的に同一の蛋白質成分の組成を有する、どのような方法によつて取得したガンマグロブリンをも使用することができる。

【0030】出発材料としては標準免疫血清グロブリン及び高度免疫血清グロブリンの何れをも使用することができる。公知のように、後者は平均母集団中に普通に見出されるよりも遥かに高い特異性抗体に対する力価を有している選ばれた供血者から得た血漿または血清から製造される。このような供血者は、特定のワクチンによつて最近免疫を与えられたか、さもなければ感染または疾病から最近回復したものの何れかである。これらの高力価の血清または血漿を集めて、分屑I I が単離する点まで通常のコーン分別手順を施す。現在、高度免疫血清グロブリンに対するビユーロー・オブ・ビオロジックス

(B o B) 抗体標準は、筋肉内に投与すべき製品に基づいている。これらの標準は還元したグロブリン(1~10ml)の標準的な筋肉内用量を投与するという仮定に基づいている。所望の免疫学的応答を達成するために必要な抗体の量は、静脈内に投与した場合には実質的に低下するから、同一の血清抗体力価を与える静脈内用量は筋肉内用量よりも実質的に少ないことは明らかである。すなわち、筋肉内I S Gと高度免疫血清グロブリンの用量は、同じ抗体活性のグロブリンを静脈内に投与するとき同一の血清抗体力価を達成するために必要な用量よりも高くなければならない。

【0031】出発する湿つたペーストまたは凍結乾燥した粉末を一定量の水またはその他の生理学的に受容しうる基剤中に溶解して、約0.5~20%、好ましくは約5%の濃度の蛋白質溶液とする。分屑I I Iの濾液を用いる場合には、常法によつて望ましい蛋白質濃度に濃縮しなければならない。この方法においてはどのような蛋白質濃度を用いてもよい。しかしながら、上記の範囲が実際の見地から好適である。

【0032】蛋白質を溶解または濃縮したのち、たとえば塩酸のような生理学的に受容しうる酸の添加によつ

$$\Sigma \{ [C^+]^2 (Z^+)^2 + [C^-]^2 (Z^-)^2 \}$$

$$\Gamma/2 =$$

ここで C^+ =たとえば Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などのような金属イオンを包含する陽イオンであり、 C^- =たとえば Cl^- 、 Br^- のようなハロゲンイオン、酢酸またはクエン酸イオンなどのようなカルボン酸イオンを包含する陰イオンであり、 $Z^+ = C^+$ の電荷であり、且つ $Z^- = C^-$ の電荷である。

【0037】前記のようなイオン強度は約0.001またはそれ以下であることが好ましい。上記の処理は、たとえば限外濾過、透析濾過(diafiltration)、透析などのような標準的な方法またはそれらの組合せによつて行なうことができる。たとえば適当なpHにおける蛋

て、約3.5~5.0、好ましくは約3.8~4.2のpHに調節する。一般に、蛋白質溶液中の単量体物質を最大に保つ点にpHを調節する。しかしながら、pHはゲル化をもたらすほど低くてはならない。温度はI S G材料に対して有害であつてはならない。良好な結果は約0~20℃の温度範囲内で得られる。このように調節した材料を次の段階前に何らかの時間にわたつて保持する必要はない。しかしながら、所望するならば、材料を何らの悪影響なく保存することもできる。

10 【0033】pHの調節後に蛋白質溶液を処理して、そのイオン強度をI S G製剤の単量体含量が約90%よりも高く、好ましくは約95%よりも高く、且つさらに好ましくは約98%よりも高くなり、且つ実際の及び潜在的抗補体活性がI S G製剤を静脈注射可能ならしめるようなものとなる水準まで低下させる。そのためには、実際の抗補体活性が約2mg蛋白質/ C' H 50単位よりも高くなければならない。生成物の非特異的補体結合活性は、任意的に力価測定した補体とヘモリシンを用いて測定する。抗補体活性として知られる補体結合活性は1 C' H 50単位を不活性化(結合)することができる蛋白質製品mgとして記す。1 C' H 50単位は任意的に力価測定した補体及びヘモリシン系中の補体の50%を活性化することができる蛋白質の量として定義する。

【0034】溶液のイオン強度($\Gamma/2$)は、5%蛋白質溶液としての製品が約15NTU(国定濁度単位)未満、好ましくは約2NTU未満の比濁分析の読みを有しているようなものでなければならない。

30 【0035】本発明では、米国、コロラド州ラブランド(loveland)のハツチ(Hach)社によつて製造されたハツチレシオー濁度計(Hach Ratio Turbimeter)を使用して、比濁分析を行つた。イオン強度($\Gamma/2$)は下式のように定義される：

【0036】

【数1】

2

白質溶液を少なくとも5容量の水の交換で、通常は約4~8容量の交換によつて透析濾過して、イオン強度を少なくとも約0.001に低下させる。この処理の間にペプチド及びたとえばアルコールのようなその他の不純物の濃度もまた、一般に痕跡量まで低下する。

【0038】上記の処理後または処理中に、pHを測定し且つ約3.5~5.0の範囲内に保つ。

【0039】このように処理した材料の蛋白質濃度を、次いで、たとえば5%、10%、15%、等々というように、最終製品中で望ましい水準に調節する。この調節はI S Gに対して有害でない通常の方法、たとえば限外濾過、逆浸透、昇華、蒸発などによつて達成される。や

はり、製剤のpHは約3.5~5.0、好ましくは約3.8~4.2の範囲内に保つ。

【0040】次いでISG製剤を緊張性(tonic)ならしめる、すなわち、それを生理学的な状態と両立するようにさせるため、またはそれを注射において生理学的に受容しうるものとするために、処理する。これに関しては、製剤のイオン強度(前記参照)を高めることなしに緊張性(張度、tonicity)が得られるようにしなければならないということに注意することが重要である。この目的は、ISG製剤に一定量の、たとえばグリシンなどのようなアミノ酸、またはマルトース、デキストロース、フルクトース、などのような炭水化物、あるいはたとえばマンニトール、ソルビトールなどのような糖アルコールまたは緊張性を与えるために十分なそれらの混合物を加えることによつて達成される。たとえば、ISG製剤を緊張性とするためには、それを約10%のマルトース(重量/容量に基づいて)と混合すればよい。

【0041】与えられた溶液の張度は、溶媒のmオスモル(osmols)/kg(本発明の場合、溶媒は水)の単位として表わされる。

【0042】市販の静脈用免疫グロブリン溶液は、250~650mオスモル/kgの浸透圧値(osmolality value)を示しているが、一般的に許容されている浸透圧値の範囲は295~315または289~308である。

【0043】上記の調節後に、通常は適当な媒体を通じる滅菌濾過によつて滅菌し、次いで最終的な容器中に充填する。最終容器中に詰めたのちに滅菌ISG製品を凍結乾燥することも可能である。静脈注射用には凍結乾燥した材料を注射前に医学的に許容しうる水に溶解する。製品を凍結乾燥前に緊張性としなければ、凍結乾燥した材料を、医学的に許容しうる水と製剤を緊張性ならしめるべき量の前記の物質の中の一つを含有する溶液中に、溶解しなければならない。

【0044】本発明のISGは主として静脈内投与に向けたものであるけれども、ISG製剤は、適当な賦形剤を含有しているならば、筋肉内に投与することもできる。それ故、本発明の組成物局面は、静脈内投与に適合する製薬学的に許容しうる水性の基剤中の本発明の静脈注射可能なISGの溶液から成る組成物である。ISGは実質的に純粋である。ISGは、そのまま静脈内投与に適しているかまたはたとえば水または前記のような希釈剤による受容しうる濃度への希釈後に静脈内投与するために適している濃度、たとえば約1~18%溶液、好ましくは約1~15%以上、更に好ましくは即座の投与に対する約10%、及び投与前の希釈剤に対しては約16%の濃度で、これらの溶液中に存在することができる。ISGは、単独で、または他の血液製剤、たとえば全血、血漿、血漿蛋白質分屑、フィブリノーゲン、たとえば因子VIII、因子IX濃縮物などのような凝血因

子及びアルブミンと組合わせて、または一緒に、静脈内に投与させることができる。

【0045】その使用局面において、本発明は、通常は人への、前記の如き製薬組成物の静脈内投与に関するものである。組成物は、通常のようにして、たとえば、適切な治療量の抗体を提供する量で、投与する。16.5%蛋白質溶液に対しては、約1~25mlが通常の1回の用量である。その後の投薬は、病気の重さ及び病気の暴露の時間に依存して、通常は1~3週以内である。

【0046】前記のように、本発明の製品は、治療のために使用することができる調合薬中に混入させることができる。しかしながら、“調合薬”という術語は本明細書においては広い意味で、治療目的のためばかりでなく、この分野で公知の診断及び試薬として、たとえばワクチン、インターフェロンなどの生産のためのビールスのような有機体を血漿または血漿分屑、たとえばコーン流出液II+III、コーン分屑IV、コーン分屑V、その他、の上で生長させる組織培養物として、その他のためにも用いることができる本発明による組成物を含有する製剤を包含することを意図する。治療用としての調合薬は、治療量、すなわち、予防または治療健康方策のために必要な量、の本発明の組成物を含有していなければならない。調合薬を診断または試薬として用いようとする場合は、これは診断または試薬量のかかる組成物を含有していなければならない。同様に、組織培養物または培養基中で用いる場合には、培養基は望ましい生長を達成するために十分な組成物を含有していなければならない。

【0047】本発明のガンマグロブリンは、直接的及び潜在的の両方で、実質的に抗補体活性を有していない。

【0048】抗体力価は、出発する未変性のガンマグロブリンと著るしくは異ならない。すなわち、出発ISGの抗体力価に依存して、通常または高度免疫、たとえば破傷風または狂犬病高度免疫グロブリンである。抗体分子は、抗原と共に沈殿する能力が示すように、2価である。

【0049】本発明のISGの他の特色は、蛋白質加水分解活性を有していないことである。ISGのいくつかの試料は貯蔵したときに断片を生じることが知られている。このような断片は、しばしばプラスミンと推定される汚染する酵素による蛋白質加水分解的な消化による。断片化は溶液中の活性な抗体の量の低下を生じさせるので望ましくない。本発明の方法は、ISG中の蛋白質加水分解活性を、検出不可能な水準まで、または多くとも痕跡の水準まで、著るしく低下させる。

【0050】本発明の製品の第一の且つ重要な特徴は、その安定性である。本発明の製品は、その抗体活性、単量体含量、清澄性、抗補体活性の欠如などの顕著な変化(たとえ変化があつたとしても)なしに、長時間にわたつて貯蔵することができる。たとえば、本発明に従つて

製造した無菌の、最終容器中の材料は、前記の品質の顕著な変化なしに、6ヶ月を越える期間にわたって室温で保存することができる。

【0051】この安定性は前記のようなpHとイオン強度の調節によつて取得することができる。従来は、一方のpHとイオン強度及び他方の静脈注射の間の関係は認められていなかった。前記のようにpH4におけるガンマグロブリンの処理は公知である。しかしながら、このようにして処理した材料を次いで患者への投与のために、約7のpHにもどしていた。その上、たとえば塩化ナトリウムのような塩の添加を緊張性の取得のために使用した。

【0052】本発明の製品の関連する利益は、その緩衝能力の欠如である。本発明の製品は驚くべきことにpH3.5~5.0で投与することができる。しかしながら、イオン強度をきわめて低い水準に低下させてあるから、塩の存在により本質的にpH3.5~5.0に緩衝した材料の投与において生じるような生理学的なpHの乱れは、たとえあつたとしても、きわめて僅かにすぎない。

【0053】

【実施例】以上の例証的な実施例によつて本発明をさらに実証する。

【0054】実施例1

コーン分別スキーム（コーンら、前記文献）からの分屑III濾液（21001）のpHを、1NHClの添加によつて、4.0に調節した。約401のHClを十分

に攪拌しながら1分間に11未満の速度で加えた。次いで分屑III濾液を限外濾過装置中に計り入れた。限外濾過と透析濾過を用いて、生成物の温度を10℃よりも低く保ちながら、アルコールの濃度をできる限り迅速に低下させた。冷蒸留水を用いて約3501の一定容量に保つた。1分間当り201程度の高い流出速度が認められた。すべての分屑III濾液を約5%蛋白質まで濃縮し且つ生成物のアルコール濃度を8%よりも低く低下させたのちに、冷蒸留水を用いて7容量の交換を行なつた。生成物の温度は20℃程度まで変化するままにまかせた。次いで免疫血清グロブリン溶液を8%蛋白質まで濃縮して限外濾過装置から流し出した。透明な“水様”の状態の1201の8%免疫血清グロブリンを回収した。この材料は0.001（計算により求めた）のイオン強度と4.2のpHを有していた。この材料の部分試料を5%蛋白質において10%マルトースによつて緊張性とした。これを安定性及びその他の試験のために250mlのびん（60本）中に入れた。初期の高压液体クロマトグラフィー（HPLC）結果は、99%を超える単量体濃度を示した。このロットはIGIVに対するすべての典型的な試験に合格した。いくつかの容器を室温で貯蔵し、6ヶ月後にHPLCは単量体濃度がなお99%よりも高いことを示した。

【0055】

【表1】

第1表

HPLC単量体(99.1%) 2量体(0.9%) 3量体(0) 空隙(0)				
抗補体活性	蛋白質3mg/C' H50単位			
pKA	対照の11%			
緩衝能力	16.24ミリ当量/l			
超遠心	6.6S	90.8%		
	9.8S	9.2%		
比濁計	1.5NTU			

同様な部分試料を0.2Mの濃度までのグリシンの添加によつて緊張性とした。

【0056】実施例2

実施例1に従つて調製した1201の8%免疫血清グロブリンの部分試料（61）を1NHClで処理してpH

4.0としたのち、凍結乾燥した。この材料に注射のための水を加えて5%蛋白質濃度とした。還元した材料は下記の特性を示した。

【0057】

【表2】

第2表

HPLC単量体	(98.5%)	2量体(1.5%)	3量体(0)	空隙(0)
抗補体活性	蛋白質3mg/C' H50単位			

12

EUROPEAN PATENT APPLICATION

21 Application number: 82107262.6

51 Int. Cl.³: **A 61 K 39/395**

22 Date of filing: 11.08.82

30 Priority: 24.08.81 US 295916

71 Applicant: Cutter Laboratories, Inc., Fourth and Parker
Streets, Berkeley California 94710 (US)

43 Date of publication of application: 09.03.83
Bulletin 83/10

72 Inventor: Tenold, Robert A., 979 West L Street
Apartment 29, Benicia California 94510 (US)

84 Designated Contracting States: AT BE CH DE FR GB IT
LI LU NL SE

74 Representative: Senftl, Hannes, Dr. et al, c/o Bayer AG
Zentralbereich Patente Marken und Lizenzen,
D-5090 Leverkusen 1, Bayerwerk (DE)

54 Intravenously injectable immune serum globulin and method of preparing same.

57 A composition is disclosed which comprises a solution in a pharmaceutically acceptable carrier of an immune serum globulin, said solution having an ionic strength and a pH to maintain the monomer content and the actual and latent anticomplement activity of the immune serum globulin such that the composition is intravenously injectable. Novel methods are disclosed for preparing the above composition.

EP 0 073 371 A2

INTRAVENOUSLY INJECTABLE IMMUNE SERUM GLOBULIN
AND METHOD OF PREPARING SAME

Background of the Invention

Field of the Invention: This invention relates to
5 pharmaceutical compositions comprising novel intravenously
injectable immune serum globulin, to a process for its
production and to its use to administer immune serum
globulin intravenously for human therapy.

10 Intramuscularly injectable gamma globulin preparations are
known. One such product is "HYPER-TET" (Cutter
Laboratories, Inc., Berkeley, California).

The usual intramuscular gamma globulin preparations cannot
15 safely be administered intravenously because such
administration causes an unacceptably high incidence of
reactions, especially in agammaglobulinemic recipients.
These reactions have been associated with a decrease in
serum complement levels, apparently caused by complement
20 binding by the administered gamma globulin. S. Barandun
et al., Vox Sang. 7, 157 - 174 (1962). The ability of
gamma globulin to bind complement, termed anticomple-
mentary, is greatly increased as a result of denaturation
brought about during the fractionation procedure, in
25 particular by aggregation to high molecular weight
species. The complement binding mechanism of these
aggregates appears to be identical to that of antigen-
antibody complexes. D. M. Marcus, J. Immunol. 84, 273 -
284 (1960). When the aggregates are removed by ultra-
30 centrifugation at 100,000 x gravity, a product low in
anticomplement activity is obtained which is well
tolerated upon intravenous injection. Barandun et al.,
supra.

Several approaches have been taken to the problem of rendering gamma globulin safe for intravenous administration. All of these are dependent on eliminating its anticomplement activity. Ultracentrifugation (cited
5 above) is technically unfeasible, and the product so derived regains its anticomplement activity upon storage. Treatment of gamma globulin with the enzyme pepsin at pH 4.0 results in proteolytic cleavage of the molecule to give a fragment of about 10,000 molecular weight which has
10 a sedimentation coefficient in the ultracentrifuge of about 5S, A. Nisonoff et al., Science, 132, 1770 - 1771 (1960). Even though this surviving fragment retains bivalent antibody activity and lacks anticomplement activity and is well tolerated and efficacious in
15 intravenous administration, W. Baumgarten, Vox Sang. 13, 84 (1967), the therapeutic effect provided is of unacceptably short duration since it is rapidly excreted, having a circulating half-life of only 18 hours, perhaps somewhat longer in agammaglobulinemic patients, compared
20 to 19.8 days for unmodified gamma globulin. E. Merler et al., Vox Sang. 13, 102 (1967); B. Jager, Arch. Intern. Med. 119, 60 (1967). Although the much reduced half-life of pepsin treated gamma globulin is probably due in part to the drastic reduction in size of the molecule, there
25 are indications that the rate of catabolism of gamma globulin is related to specific properties of the portion of the molecule digested by pepsin. J. L. Fahey et al., J. Exper. Med., 118, 1845 - 1868 (1963). This portion of the molecule remains intact in the present invention. An
30 additional disadvantage of the pepsin treatment procedure is that the pepsin which remains present is of animal origin and can stimulate antibody production, particularly upon repeated administration. C. Blatrix et al., Presse Med. 77, 635 - 637 (1969). The use of plasmin of human

origin avoids this difficulty and is the basis of a different process for preparation of intravenous gamma globulin.

- 5 Treatment of gamma globulin with human plasmin results in cleavage into three components of about 50,000 molecular weight. J. T. Sgouris, Vox Sang. 13, 71 (1967). When sufficiently low levels of plasmin are used, only about 15 percent of the molecules are cleaved, with 85 percent
- 10 remaining as intact gamma globulin. Sgouris, supra. The intact gamma globulin remaining undigested shows little anticomplement activity and has been administered intravenously without adverse reactions. J. Hinman et al., Vox Sang. 13, 85 (1967). The material thus prepared
- 15 appears to retain in vitro and in vivo protective activity. F. K. Fitzpatrick, Vox Sang. 13, 85 (1967). One disadvantage of this approach is that the plasmin cannot be completely removed. Thus, degradation continues even when the material is stored at 4° C.
- 20 Incubation of gamma globulin at pH 4.0 at 37° C. for various lengths of time has been observed to reduce the anticomplement activity to low levels. It has been suggested that this result may arise from a small quantity
- 25 of serum enzyme present as an impurity in the gamma globulin. Blatrix et al., supra. As with the plasmin treated gamma globulin, this "pH 4.0 gamma globulin" has been found to regain anticomplement activity, upon storage, at an unpredictable rate, so that it is necessary
- 30 to assay anticomplement activity before administration to a patient. J. Malgras et al., Rev. Franc. Trans., 13, 173 (1970).

Both plasmin treated gamma globulin, Hinman et al., supra, and pH 4.0 gamma globulin, H. Koblet et al., Vox Sang. 13, 93 (1967); J. V. Wells et al., Austr. Ann. Med. 18, 271 (1969); Barandun et al., Monogr. Allergy, Vol. 9, 39 - 60 (1975), Barandun et al., Vox Sang., Vol. 7, 157 - 174 (1962), have shorter half-lives in vivo than unmodified gamma globulin. For example, the half-life in normal patients of pH 4.0 gamma globulin is about 14 days, Koblet et al., supra, while the plasmin treated material shows a half-life of 16 days, Merler et al., supra.

The Centre National de Transfusion Sanguine (C.N.T.S.) in Paris has, by careful fractionation and filtration of gamma globulin from selected fresh plasma, produced an intravenously injectable gamma globulin with low anti-complement activity. Blatrix et al., supra; ibid., Presse Med., 77, 159 - 161 (1969); M. Steinbuch et al., Vox Sang. 13, 103 (1967). It is apparently not totally devoid of anticomplement activity, as it must be administered carefully and reactions do occur in some patients. Cortisone may be given prior to injection to eliminate these reactions, but the apparent incomplete removal of anticomplement activity would seem to be detrimental to its widespread use.

The effects on anticomplement activity of reduction of disulfide linkages of gamma globulin followed by reaction with a blocking agent has been investigated in the prior art. S. Barandun et al., supra, found that treatment of a 7 percent solution of gamma globulin with 0.2 M cysteamine, followed by 0.2 M iodoacetamide, resulted in almost complete loss of anticomplement activity whereas treatment with cysteamine or iodoacetamide alone did not significantly decrease anticomplement activity. Because

of the toxicity of iodoacetamide, these investigators did not pursue this approach to an intravenously injectable gamma globulin.

- 5 A modified immune serum globulin was described in U.S. Patent No. 3,903,262. The immune serum globulin was rendered intravenously injectable by first reducing to -SH groups a portion of the disulfide linkages of the molecule and then alkylating the -SH groups. After the product was
10 separated from the reaction mixture, it was sterilized. The so-produced material was intravenously injectable, substantially free from both actual and latent anticomplement activity, having substantially the biological half-life and spectrum of antibody activity of
15 corresponding unmodified immune serum globulin.

- Currently, there are several intravenously injectable gamma globulin products available outside the United States. One such product is INTRAGLOBIN of Biotest in
20 Frankfurt. This product is made by beta-propiolactone treatment of gamma globulin (Stephan, Vox. Sang., 1975, Vol. 28, pp. 422 - 437). The material has a molar concentration of sodium ion of about 0.18 and of chloride of about 0.27. The beta-propiolactone used in its
25 preparation is suspected as a carcinogen.

- Another intravenously injectable product is manufactured by Green Cross Corporation of Japan (U.S. Patent No. 4,168,303). It is a lyophilized, natural gamma globulin
30 preparation having an anticomplementary activity of less than or equal to 20 C'H50 units and 0.06 - 0.26 parts by weight of a neutral mineral salt such as sodium chloride.

The Swiss Red Cross has an immunoglobulin SRC for intravenous administration. SRC contains more than 80% of monomeric IgG and minor fractions of dimeric, polymeric, and fragmented IgG as well as traces of IgA and IgM. The distribution of IgG subclasses equals that of normal serum. The product is manufactured in lyophilized form and contains 3g of protein, 5g of saccharose and a small quantity of sodium chloride per unit. A diluent (100 ml) contains 0.9% sodium chloride.

10

VENOGLOBULIN (Green Cross Corporation of Japan) is prepared by treating gamma globulin with plasmin. It also contains 0.5 parts of a protein stabilizer (e.g. amino acetate) per 1 part by weight of plasmin treated gamma globulin. The product is distributed as a white powder and is dissolved in a diluent for use. The resulting solution is clear or slightly turbid and has a pH of 6.4 - 7.4.

20 An intravenously injectable gamma globulin has been developed by Schwab of Germany and contains 50 mg per ml immunoglobulin, 7 mg/ml glycine, and 7 mg/ml sodium chloride.

25 Schura of Germany manufactures an intravenously injectable gamma globulin by adsorption onto hydroxyethyl starch. The product is distributed as a solution having a pH of 6.7 and a conductivity of 450 mosm. and containing 2.5% glucose, 165 meq/l of sodium ion and 120 meq/l of chloride ion.

30

VEINOGLOBULINE is available from Institute Merieux of France. It is a plasmin-treated gamma globulin distributed as a lyophilized powder containing 5 g. of

protein and enough glycine and sodium chloride to insure pH and stability. The diluent is 100 ml of water for injection containing 0.9 g. of sodium chloride or isotonic glucose.

5

U.S. Patent No. 4,160,763, assigned to Behringwerke AG of Germany, is directed to an immunoglobulin for intravenous administration having reduced complement fixation made by treating an immuno globulin fraction with a low

10 concentration of a sulfitolytic agent and/or phosphate which is sparingly soluble in water. The pH of the material is 7.0, and the product contains 0.85% sodium chloride and 2.5% (g/v) glycine prior to lyophilization.

15 Teijin Institute of Tokyo is the assignee of record of U.S. Patent No. 4,059,571 for a novel immunoglobulin derivative. A water soluble composition for intravenous injection which contains the novel derivative is described. The derivative is the S-sulfonated product of
20 cleaved interchain disulfide bonds of gamma globulin.

GLOVENIN, a pepsin-treated human immunoglobulin, is manufactured by Nihon Seigaku of Japan. Typically, a solution of the above product contains 50 mg/ml of
25 pepsin-treated immunoglobulin, 2.25% (w/v) of aminoacetic acid, and 0.85% (w/v) sodium chloride.

Yamanouch Seiyaku is the distributor of GLOBULIN V, a dried pepsin-treated human immunoglobulin (500 mg)
30 containing 225 mg of aminoacetic acid and 85 mg of sodium chloride. For intravenous administration the dried product is dissolved in 10 ml of water for injection.

Summary of the Invention

5 The invention relates to an unmodified intravenously injectable immune serum globulin having an ionic strength and a pH such that the monomer content of the immune serum globulin is greater than about 90% and the actual and latent anticomplement activity is maintained such that the immune serum globulin is intravenously administrable to a broad spectrum of patients.

10

The product of the invention is prepared by a method wherein an immune serum globulin (ISG) is solubilized to yield a solution of a certain protein concentration. The pH of this solution is adjusted, and the ionic strength of the solution is reduced, to a level such that the monomer content of the ISG is greater than about 90% and the actual and latent anticomplement activity is such that the ISG product is rendered intravenously injectable. The pH and ionic strength are maintained at the above levels during protein concentration adjustment, sterilization, filling into final containers, and the like.

25 One advantage of the ISG of the invention is that it is intravenously injectable thus avoiding the problems associated with intramuscularly injected material. Furthermore, the present product is substantially free from chemical modification such as occurs in reduction-alkylation, beta-propiolactone treatment, and the like.

30

An important feature of the product of the invention is that it is substantially free of actual and latent anticomplement activity and also substantially free of polymeric material or "aggregates". Particularly, the

product of the invention exhibits enhanced stability over prior art preparations. The material may be kept at room temperature for long periods in the absence of additives with retention of its monomer content and lack of actual
5 and latent anticomplement activity.

Another advantage of the invention is that the intravenously injectable ISG is virtually unchanged in physical measurements and biological functions. Thus, the
10 antibody titers in the present material are not significantly different from the starting material.

Description of the Preferred Embodiments

15 The starting material for the process of this invention is unmodified human immune serum globulin. In the specification and claims the term "immune serum globulin" is used to define the substance also referred to in the literature variously as gamma globulin, IgG and
20 immunoglobulin G. It consists predominantly and preferably of at least about 85 percent of the 7S species of gamma globulin, which has a molecular weight of about 160,000. Any remainder is preferably 9S species, with a molecular weight of about 300,000. Both standard immune
25 and hyperimmune serum globulins, e.g., tetanus, rabies and hepatitis immune serum globulins, can be employed, the modified product being immune and hyperimmune ISG, respectively. Thus, a suitable starting material for the process of this invention is Cohn's Fraction II or
30 Fraction III filtrate. See Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946); Oncley et al., ibid., 71, 541 (1949).

Fraction II, by ultracentrifugation studies, is predominantly (about 85 percent) the 7S (sedimentation

constant of 7) species of gamma globulin with an average molecular weight of 160,000. The remaining protein is essentially 9S material with a M.W. of about 300,000. Wet Fraction II paste (approximately 30 percent solids) is
5 commonly lyophilized to obtain dry ISG powder which is then dissolved and prepared for intramuscular injection as a 16.5 percent sterile solution. Either the wet Fraction II paste or the dry ISG powder is a suitable starting material for the process of this invention.

10

Gamma globulin obtained by any process which has essentially the same composition of protein components as found in the Cohn Fraction II or Fraction III filtrate can be used as starting material in the present process.

15

Both standard immune serum globulin and hyperimmune serum globulin can be employed as starting materials. As is well known, the latter is produced from plasma or serum obtained from selected donors who have much higher titers
20 for a specific antibody than is normally found in the average population. These donors have either been recently immunized with a particular vaccine or else they have recently recovered from an infection or disease. These high titer sera or plasmas are pooled and subjected
25 to the usual Cohn fractionation procedures up to the point of isolating Fraction II. The Bureau of Biologics (BoB) antibody standards for hyperimmune serum globulins presently are based on products to be given intra-
muscularly. These standards are based on the assumption a
30 standard intramuscular dose of the reconstituted globulin (1 - 10 ml) will be administered. Because the amount of antibody required to achieve a desired immunological response is substantially less when administered intravenously, it will be apparent the I.V. dose will be

- 11 -

substantially less than the I.M. dose which will produce the same serum antibody titer. Thus, the dose of intramuscular ISG and hyperimmune serum globulin must be higher than that required to achieve the same serum
5 antibody titer when globulin of the same antibody activity is administered intravenously.

The starting wet paste or lyophilized powder is dissolved in a volume of water or other physiologically-acceptable
10 carrier to provide a protein solution of a concentration of about 0.5 - 20% preferably about 5 percent. If Fraction III filtrate is employed, the aqueous solution must be concentrated by conventional techniques to the desired protein concentration. Any protein concentration
15 may be used in this method; however, the above-recited range is preferred from a practical standpoint.

After the protein has been dissolved or concentrated, the solution is adjusted to a pH of about 3.5 to 5.0
20 preferably about 3.8 to 4.2, by addition of a physiologically-acceptable acid such as hydrochloric acid. In general, the pH is adjusted to a point whereat the monomeric material in the protein solution is maintained at a maximum. However, the pH must not be so low as to
25 result in gelation. The temperature should not be harmful to the ISG material. Good results are obtained within the temperature range of about 0 - 20° C. It is not necessary to hold the so-adjusted material for any period of time prior to the next step; however, the material may be held,
30 if desired, without detrimental effects.

Following pH adjustment the protein solution is treated to reduce its ionic strength to a level at which the monomer content of the ISG preparation is greater than about 90%,

- 12 -

preferably greater than about 95%, and more preferably greater than about 98%, and the actual and latent anticomplement activity is such that the ISG preparation is intravenously injectable. For this purpose the actual anticomplement activity should be greater than about 2 mg protein/C'H50 unit. The non-specific complement binding capacity of the product is determined using optionally titrated complement and hemolysin. The complement binding capacity, known as anticomplement activity, is reported as mg protein product capable of inactivating (binding) one C'H50 unit. One C'H50 unit is defined as the amount of protein capable of inactivating 50% of complement in an optionally titrated complement and hemolysin system.

The ionic strength ($\Gamma/2$) of the solution should be such that the product as a 5% protein solution has a nephelometric reading less than about 15 NTU (National Turbidity Units), preferably less than about 2 NTU. The ionic strength ($\Gamma/2$) is defined as follows:

$$\Gamma/2 = \frac{\sum \{ [C^+]^2 (Z^+)^2 + [C^-]^2 (Z^-)^2 \}}{2}$$

where C^+ = cations including metal ions such as Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , and the like,

C^- = anions including halide ions such as Cl^- , Br^- , carboxylic acid salt ions such as acetate or citrate ions, and the like,

Z^+ = the charge of C^+ , and

Z^- = the charge of C^- .

- 13 -

Preferably, the ionic strength, as defined, is less than about 0.001. The above treatment may be effected by standard procedures such as ultrafiltration, diafiltration, dialysis, etc., or combinations thereof.

5 For example, the protein solution at the appropriate pH may be diafiltered with at least five volume exchanges of water, usually about 4 - 8 volume exchanges, to reduce the ionic strength to at least about 0.001. During this treatment the concentration of peptides and other

10 impurities such as alcohol are also reduced, generally to trace amounts.

After or during the above treatment, the pH is measured and maintained within the range of about 3.5 - 5.0.

15 The protein concentration of the so-treated material is next adjusted to the level desired in the final product, such as, for example, 5%, 10%, 15%, and so forth. This adjustment is accomplished by conventional techniques not

20 detrimental to ISG, e.g., ultrafiltration, reverse osmosis, sublimation, evaporation, etc. Again, the pH of the preparation is maintained within the range of about 3.5 - 5.0, preferably about 3.8 - 4.2.

25 Next, the ISG preparation is treated to render it tonic, i.e., to render it compatible with physiological conditions or render it physiologically acceptable upon injection. In this respect it is important to note that tonicity must be obtained without raising the ionic

30 strength (as defined above) of the preparation. This end is achieved by adding to the ISG preparation an amount of an amino acid, such as glycine and the like, or a carbohydrate, such as maltose, dextrose, fructose, and the like, or a sugar alcohol such as mannitol, sorbitol, etc.,

or mixtures thereof sufficient to achieve tonicity. Thus, for example the ISG preparation may be mixed with about 10% maltose (on a weight to volume basis) to render the preparation tonic.

5

After the above adjustment the product is sterilized, usually by sterile filtration through appropriate media, and then filled into final containers. It is also possible to lyophilize the sterile ISG product after
10 filling into final containers. For I.V. use the lyophilized material is dissolved in medically-acceptable water prior to injection. If the product has not been made tonic prior to lyophilization, the lyophilized material must be dissolved in a diluent containing
15 medically-acceptable water and one of the aforementioned substances in an amount to render the preparation tonic.

The ISG of this invention is primarily intended for intravenous administration although the ISG preparation
20 may also be administered intramuscularly if it contains the appropriate excipients. The composition aspect of this invention therefore relates to pharmaceutical compositions comprising a solution, in a pharmaceutically acceptable aqueous carrier adapted for intravenous
25 administration, of an intravenously injectable ISG of this invention. The ISG is substantially pure. The ISG is present in these solutions in any concentration, either suitable for immediate I.V. administration or after dilution, e.g., with water or diluent as mentioned above,
30 to acceptable levels, e.g., about 1 - 18 percent solution, preferably about 1 - 15 percent and more preferably about 10 percent for immediate administration, and about 16 percent for dilution prior to administration. The ISG can be administered intravenously alone or in combination with

or in conjunction with other blood products, e.g., whole blood, plasma, Plasma Protein Fraction, fibrinogen, clotting factors such as Factor VIII, Factor IX concentrate, and so forth, and albumin.

5

In its method of use aspect, this invention relates to the intravenous administration, usually to humans, of a pharmaceutical composition as defined above. The composition is administered in a conventional manner, e.g., in an amount which provides adequate therapeutic amounts of antibody. For a 16.5 percent protein solution, about 1 - 25 ml is the customary single dose. Administration of subsequent dosages is usually within 1 - 3 weeks, depending upon the severity of the illness and the time of exposure thereto.

As mentioned above the products of the invention may be incorporated into pharmaceutical preparations, which may be used for therapeutic purposes. However, the term "pharmaceutical preparation" is intended in a broader sense herein to include preparations containing a composition in accordance with this invention used not only for therapeutic purposes, but also for diagnostic and reagent purposes as known in the art; for tissue culture wherein organisms such as viruses for the production of vaccines, interferon, and the like, are grown on plasma or on plasma fractions, e.g., Cohn Effluent II + III, Cohn Fraction IV, Cohn Fraction V, and so forth; etc. The pharmaceutical preparation intended for therapeutic use should contain a therapeutic amount of the present composition, i.e., that amount necessary for preventative or curative health measures. If the pharmaceutical preparation is to be employed as a diagnostic or a reagent, then it should contain diagnostic or reagent

- 16 -

amounts of such composition. Similarly, when used in tissue culture or a culture medium the medium should contain an amount of such composition sufficient to obtain the desired growth.

5

The gamma globulin of this invention is substantially free from anticomplement activity, both immediate and latent.

Antibody titer is not significantly different from the starting unmodified gamma globulin, i.e., it is normal or hyperimmune, e.g., tetanus or rabies hyperimmune globulin, depending on the antibody titer of the starting ISG. The antibody molecules are bivalent, as indicated by their ability to precipitate with antigen.

15

Another characterizing feature of the ISG of this invention is its absence of proteolytic activity. It is known that some samples of ISG form fragments when stored. Such fragmentation is due to proteolytic digestion by a contaminating enzyme often presumed to be plasmin. Fragmentation is undesirable since it causes a decrease in the amount of active antibody in solution. The process of this invention sharply decreases the proteolytic activity in ISG to undetectable levels or at most to trace levels.

25

A primary and important characteristic of the present product is its stability. The product may be stored for extended periods of time without significant, if any, change in its antibody activity, monomer content, clarity, lack of anticomplement activity and so forth. For example, sterile, final container material prepared in accordance with this invention has been stored at room temperature on the shelf for greater than 6 months without significant changes in the above-mentioned qualities.

30

- 17 -

This stability is obtained through pH and ionic strength adjustments as described above. The art heretofore has not recognized the relationship between pH and ionic strength on the one hand and intravenous injection on the other. As mentioned above, treatment of gamma globulin at pH 4 is known. However, the so-treated material was then returned to about pH 7 for administration to patients. Furthermore, addition of salts such as sodium chloride was employed to obtain tonicity.

A related benefit of the product of the present invention is its lack of buffer capacity. The present product is surprisingly administrable at pH 3.5 - 5.0. However, since the ionic strength has been reduced to a very low level, there is very little disruption, if any, of the physiological pH such as that which would occur with the administration of a material essentially buffered at pH 3.5 - 5.0 by the presence of salts.

Examples

The invention is demonstrated further by the following illustrative examples.

Example 1

The pH of Fraction III filtrate (2100 l.) from the Cohn fractionation scheme (Cohn et al, supra) was adjusted to 4.0 by addition of 1 N HCl. Approximately 40 l. of HCl was added at a rate of less than one liter per minute with thorough mixing. The Fraction III filtrate was then metered into an ultrafiltration system. Ultrafiltration and diafiltration were used to reduce the alcohol concentration as rapidly as possible while holding the

- 18 -

product temperature less than 10° C. Cold distilled water was used to maintain a constant volume of approximately 350 liters. Flux rates as high as 20 l. per minute were observed. When all the Fraction III filtrate had been concentrated to about 5% protein and the product alcohol concentration had been reduced to less than 8%, seven volume exchanges were performed using cold distilled water. The product temperature was permitted to drift as high as 20° C. The immune serum globulin solution was then concentrated to 8% protein and drained from the ultrafiltration system; 120 l. of 8% immune serum globulin was recovered in a clear "water-like" state. This material had an ionic strength of 0.001 (as determined by calculation) and a pH of 4.2. An aliquot of this material was made tonic with 10% maltose at 5% protein. This was filled into 250 ml bottles (60) for stability and other testing. Initial high pressure liquid chromatography (HPLC) results indicated a monomer level greater than 99%. This lot passed all typical testing for IGIV (Table 1). Several containers were stored at room temperature and after six months, HPLC results indicate the monomer content was still greater than 99%.

Table 1

25	HPLC	Monomer (99.1%)	Dimer (0.9%)	Trimer (0)	Void (0)
	Anticomplement Activity	3 mg protein per C'H50 unit			
	PKA	11% of reference			
	Buffer Capacity	16.24 meq./l.			
30	Ultra-centrifuge	6.6S	90.8%		
		9.8S	9.2%		
	Nephelometer	1.5 NTU			

- 19 -

A similar aliquot was made tonic by addition of glycine to a concentration of 0.2 M.

Example 2

5

An aliquot (6 l.) of the 120 l. of 8% immune serum globulin prepared in Example 1 was treated with 1 N HCl to obtain a pH of 4.0 and lyophilized.

10 Water for injection was added to this material to obtain a 5% protein concentration. The reconstituted material exhibited the following characteristics:

Table 2

15

HPLC Monomer (98.5%) Dimer (1.5%) Trimer (0) Void (0)
Anticomplement Activity 3 mg protein per C'H50 unit

20

25

30

CLAIMS

1. An intravenously administrable composition comprising a solution in a pharmaceutically acceptable carrier of an immune serum globulin, said solution having
5 an ionic strength less than 0.001 and a pH of 3.5 - 5.0.
2. A composition according to claim 1 characterized in that the monomer content is greater than 90 %.
3. A composition according to claims 1 or 2 characterized in that the actual and latent anticomplement
10 activity is greater than 2 milligrams of protein per one C'H50 unit.
4. A composition according to claims 1 to 3 characterized in that the immune serum globulin is hyperimmune serum globulin.
- 15 5. A stable, sterile, intravenously injectable pharmaceutical composition according to claims 1 to 4 characterized in that it comprises an aqueous solution of an immune serum globulin, said solution at 5 % protein concentration having a nephelometric reading less than
20 15 NTU and a physiologically-acceptable tonicity.
6. A composition according to claims 1 to 5 characterized in that it includes a material selected from the group consisting of carbohydrates, sugar alcohols, and amino acids.
- 25 7. A method for treating immune serum globulin to render it intravenously injectable, which comprises -

- (a) forming a solution of an immune serum globulin,
 - (b) adjusting the pH of said solution to 3.5 - 5.0, and
 - 5 (c) reducing the ionic strength of the solution while maintaining the pH of said solution at 3.5 - 5.0, to a level such that the solution at 5 % protein concentration has a nephelometric reading less than 15 NTU.
- 10 8. A method according to claim 7 characterized in that the solution in step a has a protein concentration of 0.5 - 20 % by weight.
9. A method according to claims 7 or 8 characterized in that it further includes the steps of-
- 15 (d) adding to the solution a material selected from the group consisting of carbohydrates, sugar alcohols, and amino acids, and
 - (e) sterilizing the solution.
- 20 10. A dry composition comprising immune serum globulin which upon solution in water has a pH of 3.5 - 5.0 and an ionic strength such that the solution at 5 % protein concentration has a nephelometric reading less than 15 NTU.

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 82107262.6

(51) Int. Cl.³: **A 61 K 39/395**

(22) Date of filing: 11.08.82

(30) Priority: 24.08.81 US 295916

(43) Date of publication of application:
09.03.83 Bulletin 83/10

(86) Date of deferred publication of search report: 21.09.83

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Applicant: Cutter Laboratories, Inc.
Fourth and Parker Streets
Berkeley California 94710(US)

(72) Inventor: Tenold, Robert A.
979 West L Street Apartment 29
Benicia California 94510(US)

(74) Representative: Senftl, Hannes, Dr. et al,
c/o Bayer AG Zentralbereich Patente Marken und
Lizenzen
D-5090 Leverkusen 1, Bayerwerk(DE)

(54) Intravenously injectable immune serum globulin and method of preparing same.

(57) A composition is disclosed which comprises a solution in a pharmaceutically acceptable carrier of an immune serum globulin, said solution having an ionic strength and a pH to maintain the monomer content and the actual and latent anticomplement activity of the immune serum globulin such that the composition is intravenously injectable. Novel methods are disclosed for preparing the above composition.



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 3)
A	US-A-4 093 606 (M.L. COVAL) * Claims; column 5, lines 2-19, 50-60; example 3 *	1-10	A 61 K 39/395
A	--- EP-A-0 025 719 (MORISHITA PHARMACEUTICAL CO.) * Claims *	1,6,9	
D,A	--- GB-A-2 001 325 (THE GREEN CROSS CORPORATION) * Claims; examples 1-4 *	1,6,9	
A	--- GB-A-1 495 159 (PLASMESCO AG.) -----		
The present search report has been drawn up for all claims			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. 3)
			A 61 K
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 22-06-1983	Examiner RYCKEBOSCH A.O.A.
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X particularly relevant if taken alone Y particularly relevant if combined with another document of the same category A technological background O non-written disclosure P intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

EP Form 1500 03 82